

PROCESS FOR PREPARING FUSION PROTEIN USED FOR GLUCOSE SENSOR

Patent Assignee: WUHAN INST OF VIROLOGY CHINESE (CN)

Author (Inventor): XIANEN ZHANG (CN); LIQUN CHEN (CN); WEIHONG XIE (CN)

CN 1328156 A 20011226 (Basic)

Application Data:

CN 2001114379 A 20010725

Abstract:

A process for preparing the fusion protein used for glucose sensor includes such step as synthesizing DNA chain for coding polylysine, annealing it at 65 deg.C to become dual-chain short DNA fragment, gene splicing to create the expression carrier pPICGLT of fusion protein, linearizing it by restriction endonuclease, transferring it into yeast, screening yeast recon, extracting genom DNA of yeast for test, expressing and purifying fusion protein, culturing transformant in MM culture medium at 30 deg.C for 72 hr while adding methanol once per 24 hr, linking fusion protein with ceptor, preparing glucose sensor and electrochemical test. Resultant sensor features wide linear range up to 45 mmol/L, great amplitude of response signal and long storage period.

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01114379.7

C12N 15/63

C12N 15/62 C12N 15/81

G01N 27/327 G01N 33/66

C12P 21/02 C07K 19/00

C12Q 1/68

[43] 公开日 2001 年 12 月 26 日

[11] 公开号 CN 1328156A

[22] 申请日 2001.7.25 [21] 申请号 01114379.7

[71] 申请人 中国科学院武汉病毒研究所

地址 430071 湖北省武汉市武昌小洪山

[72] 发明人 张先恩 陈立群 谢卫红

张治平 李 伟

[74] 专利代理机构 武汉科宏专利事务所

代理人 王敏锋

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图页数 4 页

[54] 发明名称 一种用于葡萄糖传感器的融合蛋白的制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用于葡萄糖传感器的融合蛋白的制备方法,其步骤是:首先合成编码聚赖氨酸的 DNA 链,将合成的 DNA 链在 65℃ 退火形成双链的短 DNA 片段;其次是通过基因拼接,构建融合蛋白的表达载体 pPICGLT;第三是表达载体 pPICGLT 经限制性内切酶 *Stu* I 线性化后,用原生质体转化法转化进酵母中;第四是酵母重组子的筛选,提取酵母的基因组 DNA 作检测;第五是融合蛋白的表达、纯化,转化子在 30℃ 下 MM 培养基中培养 72 小时,每 24 小时加一次甲醇;第六是融合蛋白与介体的连接;第七是葡萄糖传感器的制备;第八是电化学检测。本发明制备葡萄糖传感器测量线性范围宽,可达 45mmol/L,且响应信号大,保存期长。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1、一种用于葡萄糖传感器的融合蛋白的制备方法，它包括下列步骤：

A、合成编码聚赖氨酸的 DNA 链或两端含有克隆所需要的酶切位点：

5'-agctt,aag,aag,aag,aag,aaa,aag,aag,aaa,aag.aag,gc-3'

5'-ggccgc,ctt,ctt,ttt,ctt,ctt,ttt,ctt,ctt,ctt,a-3';

B、通过基因拼接，构建融合蛋白的表达载体 pPICGLT，上述合成的 DNA 链在 65℃ 退火形成双链的短 DNA 片段，质粒 pGEM-TGOL DNA 用限制性内切酶 *SnaB* I 和 *Hind*III 双酶切，琼脂糖电泳回收片段，质粒 pPIC9 DNA 用 *SnaB* I 和 *Not* I 双酶切回收片段；

C、表达载体 pPICGLT 经限制性内切酶 *Sfu*I 线性化后，用原生质体转化法转化进酵母 *Pichia pastoris* GS115 中；

D、酵母重组子的筛选，提取酵母的基因组 DNA 作 PCR 检测；

E、融合蛋白 GLT 的表达、纯化，转化子在 30℃ 下在 MD 培养基中培养，离心收集酵母细胞，将细胞重悬于 10ml 液体 MM 培养基中，每 24 小时向培养物中补加 2ml 甲醇，培养约 72 小时，离心收取上清液，用强阴离子交换柱 Q-Sepharose Fast Flow 纯化柱纯化；

F、融合蛋白 GLT 与介体的连接，融合蛋白中的聚赖氨酸链上的氨基酸与介体二茂铁甲酸上的羧基通过缩水反应连接；

G、葡萄糖传感器的制备，取经介体修饰的酶各 2μl 滴于工作电极的工作面积上，在室温下干燥后，在电极表面覆盖一层醋酸纤维膜，切成单个的电极，置于 4℃ 干燥器中备用；

H、电化学检测，将制备好的介体酶电极与电化学系统连接，用微量注射器取 20μl 待测样品滴于电极表面，启动电化学系统进行循环伏安扫描，电化学检测便开始启动，加缓冲液在 30 秒的电流值被记录下来进行分析。

2、根据权利要求 1 所述的一种用葡萄糖传感器的融合蛋白的制备方法，其特征是融合蛋白与介体的连接，首先将 80mgGOD 溶解于 4ml 的 NaHEPES 缓

01.07.30

冲液中形成微混的 pH7.3 的溶液，其次加入 100mg 的碳二亚胺和 480mg 尿素，pH7.2-7.3，第三是加入 60ml 的葡萄糖氧化酶，将溶液装入玻璃瓶中，用石蜡封好，第四是用 0.1mol/L，pH6.0 的柠檬酸缓冲液透析 48 小时，透析更换 4—8 次。

说明书

一种用于葡萄糖传感器的融合蛋白的制备方法

本发明涉及生物技术领域，更具体涉及一种用于葡萄糖传感器的融合蛋白的制备方法。

葡萄糖测定在医疗诊断、发酵工业中占有相当重要的地位。葡萄糖电极也是最早报道的、研究和应用最多、最广泛的生物传感器。1984年 Cass 等首先报道了一种以二茂铁衍生物作为电子媒介体的葡萄糖传感器，由此开创了酶-介体生物反应以及介体生物传感器的研究领域，这类生物传感器被称为第二代传感器。经与丝网印刷技术结合，构成能大批量生产的、性能优良的一次性 (disposable) 酶电极。其主导产品便携式血糖酶电极已经拥有大约 50% 世界市场份额，是迄今开发最为成功的生物传感器。然而，这类酶电极存在一个弱点，那就是线性范围比较狭窄，检测上限一般在 20—25mmol/L，不能满足高血糖病患者的需要。

本发明的目的是提供了一种用葡萄糖传感器的融合蛋白的制备方法，线性范围宽，响应信号大，解决了传统葡萄糖传感器线性范围狭窄的问题。

为了达到上述目的，本发明采用以下技术措施：所说的基因修饰的葡萄糖氧化酶是指在基因水平上，将能与介体二茂铁甲酸特异接合的聚赖氨酸引入葡萄糖氧化酶的 C 末端。经过表达、纯化，得到的融合蛋白用于制备葡萄糖传感器。其步骤是：

- 1、合成编码聚赖氨酸的 DNA 链（两端含有克隆所需要的酶切位点）：

5'-agctt,aag,aag,aag,aag,aaa,aag,aag,aaa,aag,aag,gc-3'

5'-ggccgc,ctt,ctt,ttt,ctt,ctt,ttt,ctt,ctt,ctt,a-3'

- 2、通过基因拼接，构建融合蛋白的表达载体 pPICGLT (GLT 代表所构成的融合蛋白，即含有连接肽和聚赖氨酸链的葡萄糖氧化酶)：上述合成的 DNA 链在 65℃ 退火 7 分钟形成双链的短 DNA 片段 (片段 1)；质粒 pGEM-TGOL⁽²⁾ DNA 用限制性内切酶 *SnaB* I 和 *Hind*III 双酶切，琼脂糖电泳回收约 1.7Kb 左右片段，为片段 2；质粒 pPIC9 DNA 用 *SnaB* I 和 *Not* I 双酶切回收 8.0kb 左右的片段，

为片段 3。片段 1、片段 2、片段 3 用 T_4 DNA 连接酶连接，得到融合蛋白的表达载体 pPICGLT (GLT 代表 $GOD-(Ser-Gly)_5-(Lys)_{10}$) (见附图 1)。

3、表达载体 pPICGLT 经限制性内切酶 *StuI* 线性化后，用原生质体转化法转化进酵母 *Pichia pastoris* GS115 中。

4、酵母重组子的筛选：提取酵母的基因组 DNA 作 PCR (聚合酶链式反应) 检测。

5、融合蛋白 GLT 的表达、纯化，转化子在 30°C 下 MD 培养基 (酵母基本氮源培养基 (YNB) 1.7g/L, 硫酸铵 5g/L, 葡萄糖 20g/L, 生物素 $400\mu\text{g/L}$) 培养基中培养至 $OD_{600}=1.2-1.5$, 2000 转 / 分离心收集酵母细胞。将细胞重悬于 10ml 液体 MM (YNB 1.7g/L, 硫酸铵 5g/L, 甲醇 12ml/L, 生物素 $400\mu\text{g/L}$, 酪蛋白水解物 10g/L, pH 5.6) 培养基中, 每 24 小时向培养物中补加 2 ml 甲醇, 培养约 72 小时。离心收取上清液。用强阴离子交换柱 Q-Sepharose Fast Flow 纯化柱纯化。

6、融合蛋白 GLT 与介体的连接, 融合蛋白中的聚赖氨酸链上的氨基与与介体二茂铁甲酸上的羧基通过缩水反应连接。

7、葡萄糖传感器的制备: 取经介体修饰的酶各 $2\mu\text{l}$ 滴于工作电极的工作面积上。在室温下干燥后, 在电极表面覆盖一层醋酸纤维膜, 切成单个的电极, 置于 4°C 干燥器中备用。

8、电化学检测: 循环伏安检测和计时电流检测参照 Model 270/250 电化学软件用户手册确定实验过程。将制备好的介体酶电极与电化学系统连接, 用微量注射器取 $20\mu\text{l}$ 待测样品滴于电极表面, 立即启动电化学系统进行循环伏安扫描。扫描参数如下: 起始电压 (E_i) = -0.5V , 终止电压 (E_f) = $+0.5\text{V}$, 扫描速度为 20mV/S 。样品中含有 0.1mol/L 氯化钾, 起支持电解质的作用。计时电流法用来记录响应电流, 在固定的电压下 ($+0.45\text{V}$, 相对于 Ag/AgCl 参比电极), 加入 $20\mu\text{l}$ 样品溶液后, 电化学检测便开始启动, 加缓冲液可得到背景电流值。在第 30 秒的电流值被记录下来进行实验分析。

本发明与现有技术相比, 具有以下优点和效果: 线性范围宽, 可达 45mmol/L , 且响应信号大, 保存期长。

图 1 为融合蛋白表达载体 pPICGLT 的构建流程图。

图 2 为融合蛋白琼脂糖电泳检测从重组酵母的基因组中 PCR 扩增的 GLT 基因示意图。M: 1Kb DNA 梯度分子量标准; 1: 阳性对照; 2, 3: PCR 产物; 4: 阴性对照。

图 3 为三种酶电极的循环伏安检测图。a) Fc-GLT 电极; b) Fc-GOD_e 电极; c) Fc-GOD_w 电极。(起始电压, 终止电压 (E_D) = -0.5V (E_A), 扫描速度 = +0.5V/mV/s)。

图 4 为三种酶电极的线性范围。a) Fc-GLT 电极; b) Fc-GOD_e 电极; c) Fc-GOD_w 电极。(工作电压 = 450mV)

下面结合附图对本发明作进一步详细描述:

根据图 1、图 2、图 3、图 4 可知, 其具体步骤是:

1、合成(上海生工公司)编码聚赖氨酸的 DNA 链(两端含有克隆所需要的酶切位点):

5'-agctt,aag,aag,aag,aaa,aag,aaa,aag,gc-3'

5'-ggccgc,ctt,ctt,ttt,ctt,ctt,ttt,ctt,ctt,ctt,a-3'

2、通过基因拼接, 构建融合蛋白的表达载体 pPICGLT: 上述合成的 DNA 链在 65℃ 退火 7 分钟形成双链的短 DNA 片段(片段 1); 质粒 pGEM-TGOL DNA 用限制性内切酶 *SnaB* I 和 *Hind*III 双酶切, 琼脂糖电泳回收约 1.7Kb 左右片段, 为片段 2; 质粒 pPIC9 DNA 用 *SnaB* I 和 *Not* I 双酶切回收 8.0kb 左右的片段, 为片段 3。酶切体系 (60 μ l): 10 \times buffer 6 μ l, 质粒 DNA 45 μ l, 0.1% BSA 6 μ l, 限制性内切酶 3 μ l。

酶切产物经琼脂糖电泳 (8%) 检测, 用胶回收试剂盒 (Sangon, Uniq-10) 回收目的片段。片段 1、片段 2、片段 3 用 T₄ DNA ligase 连接, 得到融合蛋白的表达载体 pPICGLT (GLT 代表 GOD-(Ser-Gly)₃-(Lys)₁₀) (见附图 1)。连接体系中片段 1、片段 2、片段 3 的 DNA 含量之比为 3: 1: 1。

连接体系 (20 μ l):

1.7Kb DNA	8 μ l,
8.0kb DNA	9 μ l,
10 \times 缓冲液	2 μ l

T₄ DNA 连接酶 1 μ l

3、表达载体 pPICGLT 经限制性内切酶 *Stu* I 线性化后，用原生质体转化法转化进酵母 *Pichia pastoris* GS115 中。

Stu I 酶切体系：

pPICGLT DNA	44 μ l
10 \times 缓冲液	6 μ l
<i>Stu</i> I	4 μ l
灭菌的双蒸水	6 μ l

原生质体转化法的步骤：将 50ml GS115 培养物培养至细胞至 OD₆₀₀=0.2，于 2000 转 / 分离心 5 分钟收集细胞，依次用 10 ml 水、10 ml SCE 溶液 (1mol/L 山梨醇，1 mmol/L EDTA，10 mmol/L 柠檬酸钠) 洗涤，重悬细胞于 10 ml SK 溶液 (1mol/L 山梨醇，67 mmol/L 磷酸钾缓冲液，pH7.5) 中，加入 20 μ l 裂解酶 (Lyticase) 30 $^{\circ}$ C 作用 30 分钟。原生质体依次用 10ml 山梨醇 (1mol/L) 洗两次，10ml CaS (10mmol/L CaCl₂，1mol/L 山梨醇) 洗一次，重悬原生质体于 0.6ml 的 CaS 中。取 100 μ l 原生质体、10 μ l 质粒 DNA、5 μ l 鲑鱼精 DNA 混合在室温下温育 20 分钟，而后加入 1.2ml PEG (3350) 继续温育 15 分钟，于 3000g/min 离心 4 分钟，收集原生质体，加入 150 μ l SOS (1mol/L 山梨醇，10mmol/L CaCl₂，0.3*YPD)，室温下温育 30 分钟，使细胞壁再生。用 1mol/L 山梨醇稀释至 0.5ml，加入保温于 56 $^{\circ}$ C 的上层琼脂培养基，然后倒在 RD 平板上，迅速用混合液盖满整个平板，室温下放置 4 分钟，让琼脂糖硬化，表面应非常平，没有突起。于室温下倒置平板 2—3 小时，让多余的水分挥发，而后在 28—30 $^{\circ}$ C 温箱中孵育 4—7 天，进行筛选。

4、酵母重组子的筛选

提取酵母转化子的基因组 DNA 作 PCR 检测。酵母基因组的提取方法具体操作步骤如下：首先制备原生质体，方法同上，重悬原生质体于 8ml lysis 缓冲液中 (含 1% SDS，10mmol/L pH7.4 Tris-HCl，10mmol/L EDTA，0.05mol/L NaCl)，加入 70 μ l 蛋白酶 K (15mg/ml) 和 80 μ l RNA 酶，在 37 $^{\circ}$ C 下温育 2 小时，并于 70 $^{\circ}$ C 下 10 分钟以终止反应，而后加入 1/10 体积的 5mol/L 的冰冷

醋酸钾缓冲液。置于冰上 30 分钟。于 4℃ 下 16,000 转 / 分离心去除白色沉淀, 加入等体积的酚-氯仿溶液 (酚: 氯仿: 异戊醇=25: 24: 1) 抽取 DNA, 将上清转移至一离心管, 加入 2 倍的 100% 冷乙醇沉淀 DNA, 离心以回收 DNA 并将其溶于 2 倍的 TE 缓冲液, 加入 1 / 10 体积的冷 3mol/L NaAc 和 0.6 倍异丙醇中沉淀 DNA, 离心去上清。最后将 DNA 溶于 100—200ul 的缓冲液中。

PCR 体系 (50 μ l):

10 \times 缓冲液	5 μ l
Mg ²⁺	3 μ l
上游引物*	1 μ l
上游引物*	1 μ l
dNTP	4 μ l
酵母基因组 DNA	1 μ l
Taq DNA 聚合酶	0.3 μ l
DDW	34.7 μ l

(*上游引物: 5'-TACGTAAGCAATGGCATTGAAGCCAGC-3'

*下游引物: 5'-GGCCGCCTTCTTTTCTTCTTTTCTTCTTCTCTTA-3')

PCR 热循环条件: 反应在 PE480 热循环仪上进行。94℃, 3 分钟, 1 个循环, 94℃, 1 分钟, 57℃, 1 分钟, 72℃, 2 分钟, 30 个循环。凝胶电泳条件: 0.5 \times TBE 缓冲液 (配制 0.7% 琼脂糖凝胶, 0.5 μ g/ μ L 溴化乙锭预染色, 60V 稳压电泳 1—2 小时, 核酸分子量对照为 1kb DNA 梯度分子量标准。紫外灯下观察和记录结果 (见附图 2)。

5、融合蛋白的表达、纯化

转化子在 30℃ 下 MM 培养基 (基本氯源培养基 YNB0.17g, (NH₄)₂SO₄ 0.5g, 5% 甲醇) 培养 72 小时, 每 24 小时加一次甲醇, GLT 融合基因在 AOX1 启动子的作用下在 *Pichia pastries*GS115 中表达。蛋白质的纯化步骤如下:

装柱→用 20% 乙醇洗柱→用双蒸水洗柱→用 0.02mol/L 柠檬酸缓冲平衡层析柱→上样→梯度洗脱 (洗脱液为 0—0.1mol/L 或 0—0.2mol/L NaCl 溶液, 洗脱速度为 1.8ml/min) →分步收集 (每管 7ml) →检测收集管中样品的酶活和蛋

白含量—收集具有酶活性的样品（约 100ml）。收集到的蛋白质经超滤浓缩—20℃保藏备用。过柱洗脱时，用 UV700 蛋白 / 核酸检测仪检测（上海六一仪器厂）在线检测蛋白质浓度。检测 GOD 酶活的方法如下：以 Sigma 公司商品 GOD(A.niger)作标准曲线。用 pH5.6、0.1mol/L 柠檬酸钠缓冲液配制 2mg/ml 葡萄糖、2mg/ml 邻联苯二茴香胺和 100U/ml 辣根过氧化物酶溶液。在 5ml 离心管中分别加入 1ml 葡萄糖溶液、2ml 甘油及邻联苯二茴香胺和辣根过氧化物酶溶液各 100 μ l。30℃保温 10 分钟后，加入 20 μ l GOD 标准溶液或样品，迅速摇匀。在 30℃下反应 30 分钟后，加入 2ml 5mol/L 盐酸终止反应，测定 OD₅₂₅。

6、融合蛋白与介体的连接

蛋白与介体的连接具体操作步骤如下：80mg GOD 溶解于 4ml 的(N—(2-羧基乙基)—咪唑—N—2(丙磺酸))(0.15mol/L)缓冲液中形成微混的 pH7.3 左右的溶液（若有必要，可适当用 0.1mol/LHCl 或 0.15mol/L 的 Na-HEPES 调节 pH 值）加入 100mg 的碳二亚胺（EDC）和 480mg 尿素，pH 值重新调节为 7.2-7.3，随后加入 60mg 的葡萄糖氧化酶，将溶液装入玻璃瓶中，用石蜡封好置于冰上过夜。用 0.1mol/L，pH6.0 的柠檬酸缓冲液透析 48 小时，在此过程中透析液更换 4—8 次，以除去没有反应的二茂铁甲酸和其他的小分子物质。将被二茂铁甲酸修饰过的融合蛋白、野生型酶、商品酶分 Fc-GLT、Fc-GOD_w、Fc-GOD_c。

7、葡萄糖传感器的制备

实验中丝网印刷电极包括一个工作电极和一个 Ag/AgCl 参比电极。在 15×15CM 的 PVC(聚氯乙烯片)上，印刷 30 个电极，电极的印刷电极过程。电极在使用前依次用酒精和水冲洗。取三种经介体修饰的酶各 2 μ l 滴于工作电极的工作面积上，在室温下干燥后，在电极表面覆盖一层醋酸纤维膜，切成单个的电极，置于 4℃干燥器中备用。

8、电化学检测

循环伏安检测和计时电流检测参照 Model 270/250 电化学软件用户手册确定实验过程。将制备好的介体酶电极与电化学系统连接，用微量注射器取 20 μ l 待测样品滴于电极表面，立即启动电化学系统进行循环伏安扫描。扫描参数如下：起始电压 (E_i)=-0.5V，终止电压 (E_f) =+0.5V，扫描速度为 20mV/S。样

01-07-30

品中含有 0.1mol/L 氯化钾，起支持电解质的作用（结果见附图 3）。计时电流法用来记录响应电流，在固定的电压下（+0.45V，相对于 Ag/AgCl 参比电极），加入 20 μ l 样品溶液后，电化学检测便开始启动，加缓冲液可得到背景电流值。在第 30 秒的电流值被记录下来进行实验分析。测量均为三支电极重复测定结果的平均值。

说明书附图

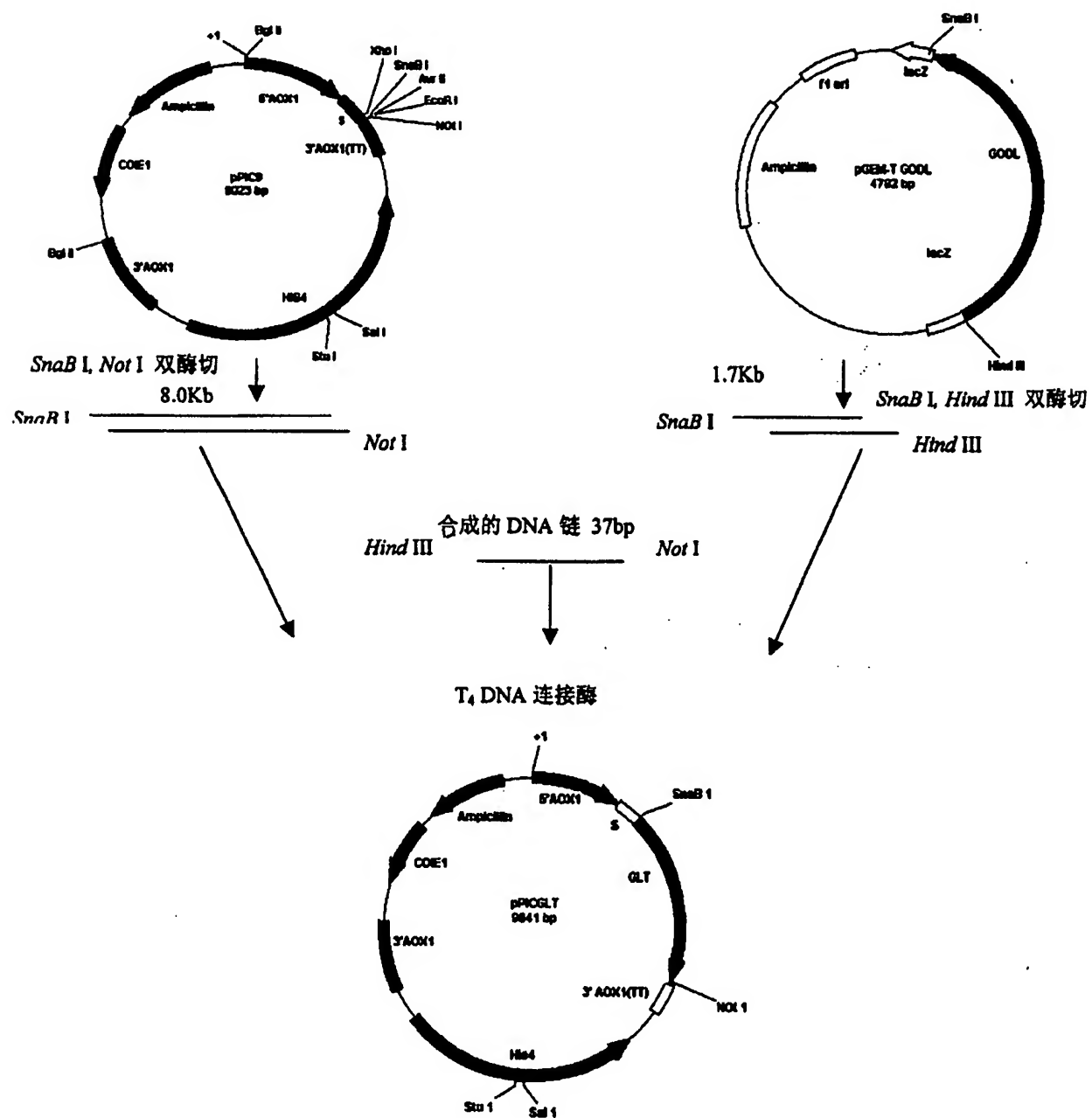


图 1

01.07.30

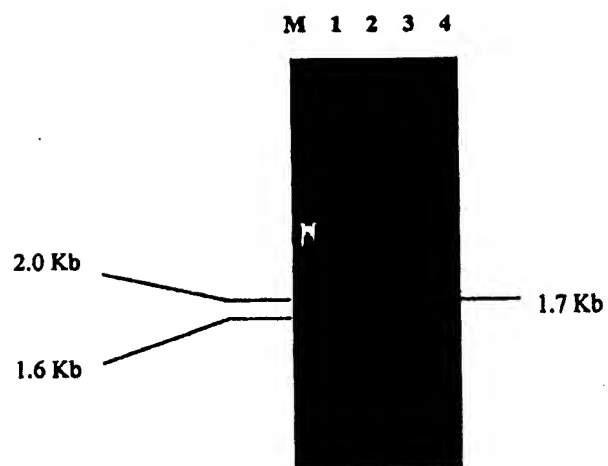


图 2

01.07.20

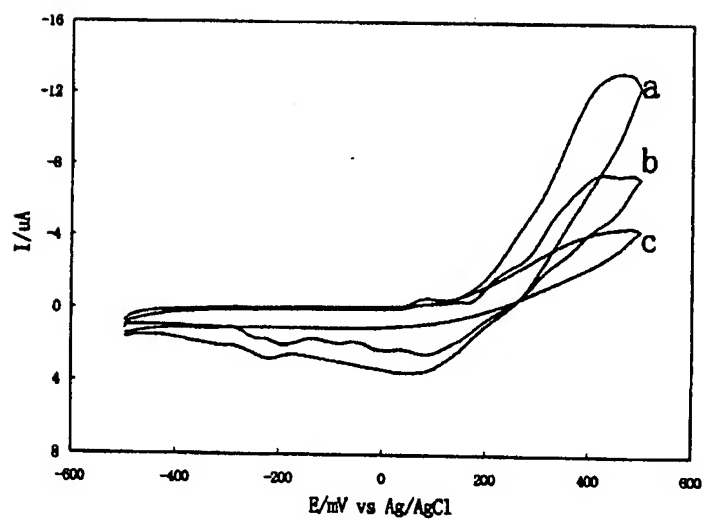


图 3

01.07.21

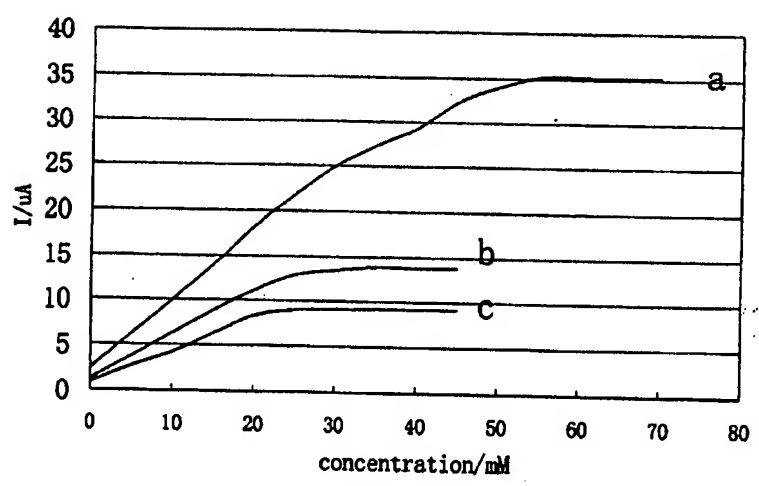


图 4